

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/12, C07K 14/475, 16/22, G01N 33/50, C12Q 1/68, A61K 39/395, 31/70, 38/18	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/24886 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Mai 2000 (04.05.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07238 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1999 (30.09.99) (30) Prioritätsdaten: 198 49 044.5 23. Oktober 1998 (23.10.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG [DE/DE]; Hugstetter Strasse 49, D-79106 Freiburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PAHL, Heike [DE/DE]; Spargelweg 32, D-79112 Freiburg (DE). (74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregentenstrasse 16, D-80538 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: PRV-1 GENE AND THE USE THEREOF (54) Bezeichnung: DAS GEN PRV-1 UND DESSEN VERWENDUNG (57) Abstract The invention relates to a nucleotide sequence coding for the PRV-1 gene and essentially comprising sequence ID No. 1 and to a method for detecting said gene as well as to the polypeptide coded by said gene. (57) Zusammenfassung Es wird eine Nucleotidsequenz beschrieben, die für das PRV-1-Protein codiert und im wesentlichen die Sequenz ID Nr. 1 umfaßt, sowie ein Verfahren zum Nachweis dieses Gens und des durch dieses Gen codierte Polypeptids.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbajdschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Das Gen PRV-1 und dessen Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Nucleotidsequenz, die das PRV-1-Gen codiert, rekombinante DNA, die diese Nucleotidsequenz enthält, Vektoren, die die rekombinante DNA enthalten und damit transformierte Zellen, sowie ein PRV-1-Polypeptid, Antikörper gegen dieses Polypeptid, Verfahren zum Nachweis des PRV-1-Polypeptids und Arzneimittel enthaltend das PRV-1-Polypeptid oder gegen das PRV-1-Polypeptid gerichtete Antikörper.

Die Polycythaemia rubra vera, auch als Polycythaemia vera oder P. vera bezeichnet, ist eine maligne hämatologische Erkrankung, bei der eine vermehrte Bildung erythroider, granulozytärer und megakaryozytärer Zellen vorliegt. Die Erkrankung ist klonalen Ursprungs und entsteht durch Mutation einer einzigen hämatopoietischen Vorläuferzelle. Die Inzidenz der P. vera beträgt 4 bis 6 pro Million Einwohner in Deutschland. Unbehandelt führt die Krankheit innerhalb von 18 Monaten zum Tod. Eine Behandlung durch Aderlässe oder Chemotherapie verlängert die durchschnittliche Überlebensdauer auf über 13 Jahre.

Die Diagnose der P. vera erfolgt über klinische Kriterien. Zum klinischen Bild gehören Kopfschmerzen, Puritus, Splenomegalie bei zwei Drittel der Patienten, Blutungen oder Thrombosen, Bluthochdruck bei einem Drittel der Patienten, Gicht, ausgelöst durch gesteigerte Harnsäureproduktion und in manchen Fällen septische Ulcera. Der wichtigste Laborbefund ist eine Erhöhung der Werte für Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl und Erythrozytengesamtvolumen sowie eine neutrophile Granulozytose oder Thrombozytose in vielen Fällen. Da einerseits die meisten Kriterien eher diffus sind und andererseits nicht alle Patienten diese Kriterien erfüllen, ist es häufig schwierig, die P. vera von anderen myeloproliferativen Erkrankungen, wie chronischer myeloischer Leukämie, oder essentieller Thrombozytämie, abzugrenzen und damit die Diagnose zu sichern. Die molekulare Ursache der P. vera ist bisher vollkommen unbekannt. Da aber die P. vera, wenn sie nicht behandelt wird, einen schweren Verlauf nimmt, ist eine genaue Diagnose wichtig.

Eine Aufgabe der Erfindung war es daher, die molekulare Ursache der Polycythaemia rubra vera aufzufinden und eine Möglichkeit zu ihrer Diagnose zu schaffen.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem ein Gen isoliert wurde, das spezifisch bei P. vera und nicht bei gesunden Kontrollen exprimiert wird. Dieses Gen wird als PRV-1-Gen (Polycythaemia rubra vera) bezeichnet.

Eine ähnliche Nucleotidsequenz wird in der internationalen Anmeldung WO 98/50552 offenbart.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Polynucleotid, das für das PRV-1-Gen codiert und im wesentlichen die Sequenz ID Nr. 1 umfaßt. Die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können einzel- oder doppelsträngige DNA oder RNA sein. Falls es sich um RNA handelt, ist dem Fachmann klar, daß anstelle von "T"-Nucleotiden "U"-Nucleotide vorliegen. Unter

"Polynucleotid" sind Nucleinsäuren mit 15 oder mehr Nucleotiden zu verstehen.

Die erfindungsgemäße Nucleotidsequenz ist in Figur 1 wiedergegeben. Gegenstand der Erfindung ist daher ein Polynucleotid, das der Sequenz von Figur 1 entspricht, sowie ein Polynucleotid, dessen Nucleotidsequenz geringfügige Abweichungen aufweist. Unter geringfügigen Abweichungen werden im Sinne der vorliegenden Anmeldung solche Sequenzen verstanden, bei denen einige wenige, vorzugsweise nicht mehr als 50 und besonders bevorzugt nicht mehr als 25 Nucleotide ausgetauscht sein können, wobei jedoch die Funktion des durch die Nucleotidsequenz kodierten Gens nicht berührt wird. Dem Fachmann ist bekannt, daß ein für eine Aminosäure kodierendes Basentriplett durch ein anderes Triplett ersetzt werden kann, das für dieselbe Aminosäure kodiert. Darüber hinaus können weniger wichtige Bereiche geringfügig deletiert und/oder mutiert sein. In einer besonderen Ausführungsform umfaßt das Polynucleotid die Nucleotide 36 bis 1346 der Sequenz Nr. 1, also den kodierenden Bereich des PRV-1-Gens. Eine weitere Ausführungsform umfaßt die Nucleotide 36 bis 1262 von Sequenz Nr. 1. Dieser Bereich kodiert vermutlich für den aktiven Bereich des PRV-1-Polypeptids. Das Polynucleotid der Erfindung kann schließlich auch die Nucleotide 39 bis 1346 oder 39 bis 1262 von Sequenz Nr. 1 umfassen, so daß das Codon, das für das Start-Methionin kodiert, nicht enthalten ist. Eine bevorzugte Ausführungsform ist ein Polynucleotid, das die Nucleotide 99-1346 oder 99 bis 1262 von Sequenz Nr. 1 umfaßt. Es sind damit die Codons am 5'-Ende, die für das Signalpeptid des PRV-1-Polypeptids kodieren, nicht enthalten.

Das erfindungsgemäße Polynucleotid kann auch ein Fragment des PRV-1-Gens sein. Das Fragment weist in der Regel mehr als 100 Nucleotide auf, bevorzugt aber mehr als 300 Nucleotide. Die Fragmente können auch als Primer oder als Sonden insbesondere für die PCR eingesetzt werden, in diesem Fall können die Fragmente dem Zweck entsprechend verkürzt sein. Üblicherweise

haben Primer eine Länge zwischen 10 und 30 Nucleotiden und Sonden eine Länge zwischen 15 und 50 Nucleotiden.

Das PRV-1-Gen ist ein körpereigenes Gen, das jedoch bei gesunden Personen nur auf wenige Organe beschränkt exprimiert wird. Normalerweise wird es im wesentlichen in den blutbildenden Organen, d.h. im Knochenmark und fötaler Leber, und schwach in der Milz exprimiert, nicht jedoch in Herz, Muskel, Pankreas oder Niere. Bei Patienten, die unter P. vera leiden, wird dieses Gen, vor allem in den hämatopoietischen Zellen, sehr stark überexprimiert.

Das PRV-1-Gen kodiert für ein Protein, das die in Figur 2 gezeigte Proteinsequenz aufweist. Das Signalpeptid, das in der Proteinsequenz sämtlicher Oberflächenmoleküle enthalten ist und bei der Prozessierung des Proteins üblicherweise entfernt wird, ist durch einen Bindestrich abgetrennt. Das Protein hat die Sequenz ID Nr. 2. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist also ein im wesentlichen reines Polypeptid der Sequenz Nr. 2 oder ein Polypeptid der Sequenz Nr. 2, bei dem das Signalpeptid nicht vorhanden ist (Aminosäuren 22 bis 437 von Sequenz Nr. 2). Weitere Ausführungsformen umfassen die Aminosäuren 1 bis 409 oder 22 bis 409 der Sequenz Nr. 2 (vermutlich aktiver Bereich des Proteins).

Das erfindungsgemäße Polypeptid ist im Hinblick auf die biologische Aktivität vorzugsweise glycosyliert, am bevorzugtesten ist es N-glycosyliert. Es kann dann an wenigstens einer der Aminosäuren Asn-46, Asn-189 und Asn-382 des PRV-1-Polypeptids glycosyliert sein (Die Aminosäurenzahlen beziehen sich auf die Sequenz Nr. 2). Die Erfindung schließt auch Fragmente der erfindungsgemäßen Polypeptide ein, die N-glycosyliert sind. Die Fragmente sind wenigstens 50 Aminosäuren lang, bevorzugt wenigstens 100 Aminosäuren, am bevorzugtesten wenigstens 150 Aminosäuren. In einer anderen Ausführungsform kann das Polypeptid O-glycosylisiert sein.

Dem Fachmann ist klar, daß bestimmte Aminosäuren gegen andere ausgetauscht sein können ohne die biologische Aktivität des Proteins zu beeinträchtigen. Solche abgewandelten Formen der erfindungsgemäßen Polypeptide sind auch Gegenstand der Erfindung. Bei den Aminosäureaustauschen handelt es sich um solche, die die biologische Aktivität des Proteins nicht negativ beeinträchtigen. Für die Auswahl der Austausche kann der Fachmann auf allgemein bekannte Regeln zurückgreifen.

Das PRV-1-Polypeptid kann herstellungsbedingt beispielsweise einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker aufweisen. Dieser ist dann an den Aminosäuren gebunden, die den Aminosäuren 407 bis 409 der Sequenz ID Nr. 2 entsprechen. Ein GPI-Anker dient dazu, ein Protein mittels eines Lipids auf der Außenseite der Zellmembran zu verankern. Aus bislang nicht endgültig geklärten Gründen beobachtet man aber häufig, daß GPI-gelinkte Proteine auch ins Medium abgegeben werden. Man spricht von einem sogenannten "shedding". Ob dies ein spezifischer Prozeß ist, das heißt solche Proteine in einer kontrollierten Weise von Enzymen aus der Membran abgespalten werden, oder ob es ein unspezifischer Verlust des Ankers ist, ist bislang nicht geklärt. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß PRV-1 sowohl an der Zellmembran als auch extrazellulär zu finden ist. Für die Wirkung als Wachstumsfaktor ist wahrscheinlich die sezernierte, nicht Membran-gebundene Form wichtiger, da sie als Wachstumsfaktor diffundieren und andere Zellen erreichen kann.

Dem Fachmann ist klar, daß er durch Manipulation dieser Aminosäuren die Membranständigkeit des Proteins beeinflussen kann. Dies betrifft vor allem die Herstellung bestimmter DNA-Konstrukte, die zur Expression des PRV-1-Polypeptids oder von Fragmenten davon bestimmt sind. Die Codons, die für diese Aminosäuren kodieren, können mutiert oder deletiert sein.

Das Gen codiert für einen Oberflächenrezeptor der uPAR/Ly6-Familie. Diese Rezeptorenfamilie kann mitogene Signale, d.h.

Signale, die die Zellteilung anregen, übertragen. Es wird daher angenommen, daß die Überexpression des PRV-1-Gens, unter anderem auf den Granulozyten von P. vera-Patienten, zu einer Hyperproliferation dieser Zellen beiträgt.

Es wurde gefunden, daß weder bei gesunden Personen noch bei Patienten mit anderen myeloproliferativen Erkrankungen, z.B. mit chronischer myeloischer Leukämie, akuter myeloischer Leukämie und essentieller Thrombozytämie, PRV-1 auf Granulozyten exprimiert wird.

Um das von dem PRV-1-Gen codierte Polypeptid für Analysen und Nachweisverfahren einsetzen zu können, wird es geeigneter Weise aus rekombinanter DNA erzeugt, wobei die rekombinante DNA bevorzugt die Nucleotidsequenz ID Nr. 1 oder wenigstens den kodierenden Bereich des PRV-1-Gens, also die Nucleotide 36 bis 1346 von Sequenz ID Nr. 1, zumindest aber die Nucleotide 39 bis 1262, funktionell verbunden mit einem Promotor, umfaßt. Die rekombinante DNA kann jedoch auch nur ein Fragment der Sequenz Nr. 1 umfassen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, der die rekombinante DNA für das PRV-1-Polypeptid oder ein Fragment davon enthält, sowie eine mit diesem Vektor transfizierte oder transformierte Wirtszelle. Die Wirtszellen können prokaryontisch sein, beispielsweise Bakterien wie E. coli. Dabei werden jedoch nicht-glycosylierte Polypeptide exprimiert. Bevorzugt sind daher eukaryontische Wirtszellen, die das exprimierte Protein posttranslational glycosylieren und anderweitig modifizieren können. Beispiele für eukaryontische Wirtszellen sind Insektenzellen wie Sf9-Zellen zur Expression nach Infektion mit rekombinanten Baculoviren, Säugerzellen wie COS-Zellen, CHO-Zellen, HeLa-Zellen. Diese Beispiele sind nicht erschöpfend. Auch Hefezellen sind als Wirtszellen möglich. Dem Fachmann ist klar, daß je nach Wirtszelle das Glykosylierungsmuster unterschiedlich sein kann. Damit kann auch die biologische Aktivität des

Expressionsprodukts variieren. Besonders bevorzugt sind Wirtszellen, die das Expressionsprodukt derart glycosylieren, daß die biologische Aktivität des Proteins erhalten ist.

Das aus Granulozyten gewonnene oder rekombinant erzeugte PRV-1-Polypeptid kann sowohl zur Diagnose von Polycythämia vera als auch zur Behandlung der Krankheit eingesetzt werden.

Eine Möglichkeit der Therapie besteht in der sogenannten "Antisense-Therapie". Bei diesem Verfahren wird ein "Antisense"-RNA-Molekül, also eine RNA, die komplementär ist zu der PRV-RNA, eingesetzt. Da die PRV-1-RNA an ihrem Anfang die Sequenz 5'-AAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCC-3' (Seq. ID-No. 3) hat, würde die erforderliche Antisense-RNA gegen diese Sequenz die folgende Nucleotidsequenz aufweisen: 5'-GGCTGGTAATCTCTTTCTGCTTTT-3' (Seq. ID-No. 4). Diese Antisense-RNA wird in einen Vektor eingebaut und in P. vera-Zellen eingebracht. Das Einbringen dieser RNA erfolgt beispielsweise über Transfektion, wobei der für die Transfektion verwendete Vektor vorzugsweise so gestaltet ist, daß er spezifisch in die P. vera-Zellen eingebracht wird. Die Expression der Antisense-RNA bewirkt, daß die PRV-1-mRNA nicht mehr zu einem Polypeptid translatiert werden kann. In derart behandelten Zellen entsteht dann kein PRV-1-Protein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zum Nachweis von P. vera, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man das PRV-1-Polypeptid oder ein Epitop davon nachweist und das Ausmaß der Expression bestimmt.

Eine Überexpression dieses Rezeptors auf reifen Zellen außerhalb des Knochenmarks, z.B. auf Granulozyten, ist ein starker Hinweis auf das Vorliegen der Erkrankung P. vera. Der Nachweis erfolgt geeigneterweise mit einem Immunoassay unter Verwendung von Antikörpern, die gegen den PRV-1-Rezeptor gerichtet sind. Als Testverfahren eignen sich die bekannten Varianten von Immunoassays, bei denen für das PRV-1-Polypeptid

spezifische Antikörper eingesetzt werden zusammen mit weiteren markierten Antikörpern, die immobilisiert oder in Lösung sein können. Die Markierung kann in an sich bekannter Weise erfolgen, z.B. mit radioaktiven Isotopen, durch Fluoreszenz oder Lumineszenz, mit Enzymen, durch farbbildende Reaktionen oder sonstige zur Bestimmung geeigneten Gruppen. Diese Varianten sind dem Fachmann bekannt und bedürfen hier keiner näheren Erläuterung. Erfindungsgemäß werden ELISA-Tests besonders bevorzugt.

Die zum spezifischen Nachweis des PRV-1-Rezeptors erforderlichen Antikörper können ebenfalls in an sich bekannter Weise hergestellt werden. Geeignet sind sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper, wobei die Verwendung monoklonaler Antikörper bevorzugt ist.

Für die Herstellung von Antikörpern können auch aus dem Protein hergeleitete Peptide benutzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden erfolgreich die Peptide mit den Sequenzen:

- a) KVSDLPRQWTPKN (Aminosäuren 34 bis 46) [Seq. ID-No. 5] und
 - b) SAREKRDVQPPASQH (Aminosäuren 391 bis 405) [Seq. ID-No. 6]
- eingesetzt.

Die polyklonalen Antikörper werden üblicherweise erzeugt, indem ein geeigneter Wirt (Kaninchen) mit dem PRV-1-Polypeptid, gegebenenfalls gebunden an einem immunologischen Träger (Adjuvans), immunisiert und eine Immunantwort hervorgerufen wird. Monoklonale Antikörper können in an sich bekannter Weise mit der Hybridoma-Technik erzeugt werden. Die Antikörper können durch Affinitätsreinigung gereinigt werden. Herstellung und Reinigung von Antikörpern sind beispielsweise beschrieben in "Antibodies: A Laboratory Manual" von Harlow und Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Weiterhin können derartige polyklonale oder monoklonale gegen PRV-1 gerichtete Antikörper auch zur Therapie der Krankheit verwendet werden.

In einer weiteren Ausführungsform kann der Nachweis des PRV-1-Rezeptors mit einem RT-PCR-Verfahren erfolgen. Dazu wird zunächst aus den PRV-1 überexprimierenden Zellen, in der Regel Granulozyten, RNA isoliert. Dann wird in an sich bekannter Weise mit einem RT-Primer eine reverse Transkription vorgenommen. Der RT-Primer ist bevorzugt ein Primer mit der folgenden Nucleotidsequenz (SEQ ID-No. 7)

ATTAGGTTATGAGGTCAGAGGGAGGTT.

Dadurch wird die spezifische PRV-1-RNA in DNA umgewandelt. Diese DNA wird dann in einer PCR-Reaktion in an sich bekannter Weise amplifiziert. Für die Amplifikationszyklen werden bevorzugt die folgenden beiden Primer eingesetzt.

Als Primer sense (SEQ ID-No. 8)

GCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGG.

Primer antisense (SEQ ID-No. 9)

GAATCGTGGGGGTAATAGAGTTAGCAGG.

Mit der offenbarten Sequenz kann der Fachmann ohne weiteres andere ebenfalls geeignete Primer auffinden.

Da die RNA als Ausgangsmaterial für dieses Verfahren verwendet wird, ist das PCR-Signal nur in solchen Fällen positiv, in denen das PRV-1-Gen auch exprimiert wird. Wie oben ausgeführt, ist dies nur dann der Fall, wenn der Patient unter P. vera leidet. Bei gesunden Patienten erfolgt keine PRV-Expression in den Granulozyten. Die Abwesenheit eines RT-PCR-Signals deutet also daraufhin, daß keine P. vera vorliegt.

In einer weiteren Alternative kann auch ein Blotting-Verfahren, bevorzugt ein Northern Blot, zur Diagnose einer P. vera benutzt werden. Für ein derartiges Verfahren wird die RNA aus Granulozyten isoliert und dann mit einem Blotting-Verfahren, z.B. Northern Blot, auf die Expression von PRV-1 untersucht. Als Sonde kann die cDNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 1 oder ein Abschnitt der Sequenz verwendet werden. Eine Hybridisierung tritt nur dann auf, wenn die Granulozyten von einem Patienten mit P. vera stammen, da nur dann eine Expression auf den Granulozyten vorhanden ist. Die Abwesenheit einer Hybridisierung deutet daraufhin, daß die Person, von der die Granulozyten stammen, keine P. vera hat.

Für die Northern Blot-Hybridisierung kann auch ein Fragment des Gens eingesetzt werden. Ein derartiges Fragment ist üblicherweise mehr als 100 Basen lang, vorzugsweise mehr als 300 Basen lang. Alternativ hierzu können durch Verdau des Gens mit Restriktionsendonukleasen verschiedene unterschiedliche Fragmente des Gens hergestellt werden, die als Sonden im Northern Blot verwendet werden können. Wenn die Fragmente von der cDNA her stammen, liegen sie als Doppelstränge vor, die für die Hybridisierung in die Einzelstränge aufgetrennt werden müssen. Geeignete Beispiele sind das Bam HI-PstI-Fragment von Basenpaar 420 bis Basenpaar 831 oder das PstI-PstI-Fragment von Basenpaar 831 bis Basenpaar 1900.

Der Nachweis von PRV-1-mRNA und damit der PRV-1-Expression kann auch dadurch erfolgen, daß zunächst in einer RT-PCR-Reaktion die mRNA revers transkribiert wird und die cDNA anschließend amplifiziert wird und dann die amplifizierte DNA mit einer Sonde in einem Hybridisierungsverfahren nachgewiesen wird.

Bei einer positiven Diagnose muß die Krankheit behandelt werden, da sie ansonsten in relativ kurzer Zeit zum Tod führt. Hierzu können spezifische gegen PRV-1 gerichtete Antikörper

verwendet werden, an die gegebenenfalls zytotoxische Komponenten gebunden sein können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Arzneimittel, das neben üblichen Trägern gegen den PRV-1-Rezeptor gerichtete Antikörper enthält.

Da bei der P. vera der PRV-1-Rezeptor überexprimiert wird, kommt es bei Kontakt mit dem Anti-PRV-1-Antikörper zur Bindung von vielen Antikörpern auf der Oberfläche der befallenen Granulozyten. Die Bindung vieler Antikörper an diesen Zellen ist ein Anreiz für die immunologischen Zellen, diese Zellen zu zerstören. Auf diese Weise ist eine spezifische Eliminierung der P. vera-Zellen möglich.

Überraschenderweise wurde auch gefunden, daß das PRV-1-Polypeptid hämatopoietische Aktivität aufweist. Das PRV-1-Polypeptid ist in der Lage, bestimmte hämatopoietische Vorläuferzellen zur Bildung erythroider Kolonien anzuregen. Vor allem die N-glycosylierten Polypeptide von PRV-1 weisen diese Funktion auf. Von den erfindungsgemäßen Polypeptiden sind daher die N-glycosylierten PRV-1-Polypeptide und Fragmente davon, die die Wachstumsfaktoraktivität aufweisen, bevorzugt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist daher ein Arzneimittel, das neben einem pharmazeutisch verträglichen Träger das PRV-1-Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment davon enthält. Bevorzugt handelt es sich um glycosyliertes PRV-1-Polypeptid, noch bevorzugter um N-glycosyliertes PRV-1-Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment davon. Die Erfindung betrifft auch Arzneimittel, die wenigstens ein erfindungsgemäßes Polynucleotid enthalten.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von PRV-1-Polypeptid oder einem biologisch aktiven Fragment davon als Wachstumsfaktor in vivo und ex vivo. Das PRV-1-

Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment davon kann verwendet werden zur Behandlung sämtlicher pan-Zytopenien und pan-Zytopathien im Knochenmark und in der Zirkulation (Änderung der zellulären Bestandteile des peripheren Blutes und des Knochenmarks). Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können beispielsweise verwendet werden zur Behandlung von Anämien bei Nierenversagen, Chemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung, zur Behandlung von Neutropenien und Thrombozytopenien unter Chemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung, zur ex vivo Behandlung von peripheren oder Knochenmarks-Stammzellen zur Expansion (Vermehrung) und Retransfusion in den Patienten, und zur Behandlung von Sepsis, "systemic inflammatory response syndrome" (SIRS) oder regionaler Entzündungsreaktion. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung oder diese enthaltende Arzneimittel können auf verschiedenste Weise appliziert werden. Die Darreichungsformen umfassen intravenöse, intramuskuläre, subkutane, intraperitoneale, orale, transdermale und transmukosale Verabreichung.

Auch die erfindungsgemäßen Polynucleotide können zur Behandlung von pan-Zytopenien und pan-Zytopathien verwendet werden. Ziel ist dabei die Expression eines PRV-1-Polypeptids oder eines funktionellen Fragments davon in Zellen des betroffenen Patienten. Dabei kommen vor allem Verfahren der Gentherapie zur Anwendung. Zellen des Patienten können isoliert werden und mit einem erfindungsgemäßen Polynucleotid transfiziert werden (ex vivo-Manipulation), um dann dem Patienten wieder zugeführt zu werden. Es sind auch Verfahren denkbar, bei denen die erfindungsgemäßen Polynucleotide durch viralen Transfer in die Zielzellen gelangen. Expression der eingeführten Nucleinsäuren führt dann zu hämatopoietischer Aktivität.

Die Erfindung betrifft auch Kits zum Nachweis entweder von Polycythaemia vera oder von Störungen des hämatopoietischen Systems. Diese enthalten ein erfindungsgemäßes Polynucleotid

und/oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und/oder einen oder mehrere erfindungsgemäßen Antikörper. Darüber hinaus kann das Kit noch einen Behälter oder Zusammensetzungen, die zur Durchführung von Nachweisreaktionen geeignet sind, enthalten. Beispiele für solche Zusammensetzungen sind Pufferlösungen, Reagenzien zum Blockieren von Membranen, Hybridisierungslösungen, sekundäre Antikörper, Substratlösungen für Nachweisreaktionen und andere. Das Kit wird bevorzugt zur Durchführung von PCR-Reaktionen, Northern Blots, Southern Blots, Western Blots, ELISA, RIA oder ähnlichen Reaktionen verwendet.

Zur Erläuterung werden folgende Beispiele angegeben.

Beispiel 1

Charakterisierung des PRV-Gens

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um das Gen zu charakterisieren:

- Granulozyten wurden aus Blutkonserven oder Aderlässen von P. vera Patienten nach folgendem Protokoll isoliert:

- Blut wurde mit einem gleichem Volumen an 3% Dextran-Lösung in 0.9% NaCl versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehengelassen.

- Der Ansatz trennte sich in zwei Phasen. Die obere helle Phase wurde abgenommen und 10 Minuten bei 1800g und RT zentrifugiert.

- Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im gleichen Volumen 0.9% NaCl resuspendiert.

- Jeweils 35 ml der Zellen in NaCl wurden auf 15 ml Ficoll-Hypaque geschichtet.

- Dann wurde 60 Minuten bei 1800g und RT ohne Bremse zentrifugiert.

- Es bildeten sich ein Zellpellet und zwei Schichten mit

einer Interphase.

- Schichten und Interphase wurden abgesaugt und das Zellpellet 30 Sekunden lang in 10 ml eiskalter 0.2% NaCl resuspendiert und nach 30 Sekunden wurden sofort 10 ml eiskalte 1.6% NaCl zugegeben.

- Die Zellen wurden 10 Minuten bei 1800g und RT abzentrifugiert.

- Dann wurde einmal in 10 ml PBS gewaschen und abzentrifugiert.

- Das Zellpellet enthielt 95-99% reine Granulozyten.

- Aus diesen Zellen wurde mit Standardmethoden RNA isoliert.

- 10 mg dieser RNA wurden in einem Northern-Blot auf die Expression von PRV-1 untersucht. Als Sonde wurde die gesamte cDNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 1 verwendet.

Dieser Versuch wurde an 19 P. vera Patienten und 21 Kontroll-Blutkonserven durchgeführt. Es wurde eine starke Hybridisierung der PRV-1 Sonde bei P. vera Patienten gefunden. Bei gesunden Kontrollen wurde keine Hybridisierung beobachtet.

Beispiel 2

PRV-1 hat Wachstumsfaktor-Aktivität

Aus einer schwangeren Maus wurden Embryos am Tage 13,5 nach Befruchtung entnommen. Die fötalen Lebern wurden entnommen. Die darin enthaltenen Zellen wurden mittels Antikörper angefärbt und durch Säulen-Chromatographie für bestimmte Zellen angereichert, für andere Zellsorten depletiert. Es resultiert ein Zellgemisch, das für bestimmte hämatopoietische Vorläuferzellen (sog. colony forming units-erythroid, CFU-E) angereichert ist. So sind in der fötalen Leber insgesamt ungefähr 2% CFU-E, in den angereicherten Zellen aber 30-40% CFU-E.

Diese CFU-E wurden retroviral transfiziert. Dazu wurde 48 Stunden vorher eine sogenannte "packaging cell line", genannt 293-T, ihrerseits transfiziert. 293-T-Zellen sind eine etablierte humane embryonale Nieren-Zelllinie. 293-T-Zellen sind stabil mit mehreren Genen eines Retrovirus transfiziert. Werden nun diese 293-T-Zellen mit zwei Plasmiden, genannt pOS und pKAT, transfiziert, produzieren die 293-T-Zellen ein Retrovirus, das murine fötale Leberzellen infizieren kann. Transfiziert man die 293-T-Zellen mit einem leeren pOS-Vektor und pKAT, wird ein "wild typ" Retrovirus produziert, das nur retrovirale Proteine exprimiert. Hat man hingegen in den pOS-Vektor ein humanes Gen einkloniert, z.B. PRV-1, wird ein Retrovirus produziert, das, wenn es Zellen infiziert hat, dieses Protein exprimiert. Das Retrovirus wird von den 293-T-Zellen in das Zellkultur-Medium sezerniert.

Nach zwei Tagen wird das Zellkultur-Medium der transfizierten 293-T-Zellen, welches das Retrovirus enthält, geerntet und einmal durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Um die fötalen Leberzellen zu transfizieren, werden diese Zellen mit dem filtrierten Zellkultur-Medium, welches das Retrovirus enthält, vermischt und 2 Stunden bei 1800 rpm, 20°C unter Zugabe von Polybren zentrifugiert. Anschließend werden die transfizierten fötalen Leberzellen in einem Medium kultiviert (Methocult, der Firma Cell Systems), welches zusätzlich zu den üblichen Salzen und Aminosäuren, fötales Kälberserum, 0,0001-0,4 IU/ml Erythropoetin (EPO) und Methylcellulose (0,8%) enthält. Das EPO benötigen die CFU-E, um hämatopoetische Kolonien auszubilden. Durch die Methylcellulose wird das Medium Gelee-artig fest, und es gelingt, einzelne Zellen in diesem Gelee zu fixieren, so daß sie sich, anders als in flüssigem Medium, nicht bewegen können. Daher kann beobachtet werden, ob sich aus einer einzelnen Zelle eine hämatopoetische Kolonie formt oder nicht. CFU-Es bilden erythroide Kolonien, also Kolonien, die rote Blutzellen und deren Vorläuferzellen enthalten.

Nach drei Tagen wird gezählt, wie viele hämatopoietische

Kolonien sich entwickelt haben. Verschiedene Ansätze werden verglichen. Nicht in jedem Experiment wurden alle Ansätze überprüft; Ansätze 1-3 sind sehr ähnliche Kontrollen und können jeweils einzeln mit Ansatz 4 verglichen werden.

Ansatz 1: Zellen, die nicht retroviral transfiziert wurden;

Ansatz 2: Zellen, die mit einem leeren pOS-Vektor transfiziert wurden;

Ansatz 3: Zellen, die mit einem "green fluorescent Protein" (GFP), einem nicht hämatopoietisch aktiven Protein, transfiziert wurden.

Ansatz 4: Zellen, die mit pOS-PRV-1 (Vektor + erfindungsgemäßes Gen) transfiziert wurden.

Tabelle 1: Die Ergebnisse von drei wie beschrieben durchgeführten Versuchen sind aufgeführt. Die Zahlen geben jeweils die Anzahl der Kolonien an.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
	nicht transfiziert	leerer Vektor (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
Versuch 1	116	156	80	326
Versuch 2		271	273	410
Versuch 3	120		131	291

Die Versuche zeigen, daß CFU-E, die mit PRV-1 transfiziert waren, sehr viel mehr Kolonien (bis zu 3-fach erhöht) bilden, als die diversen Kontroll-CFU-E. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß PRV-1 einen Wachstumsfaktor für CFU-E darstellt.

Beispiel 3

Löslichkeit des Wachstumsfaktors PRV-1

Um zu untersuchen, ob PRV-1 einen löslichen Wachstumsfaktor darstellt, oder Zell-Zell-Kontakt notwendig ist, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Die "Verpackungs-Zelllinie",

293-T, produziert nicht nur nach Transfektion mit den pOS- und pKAT-Vektoren ein Retrovirus. Zusätzlich synthetisieren die 293-T-Zellen auch das von dem in pOS klonierten Gen kodierte Protein, also im vorliegenden Fall PRV-1. Ist das Genprodukt ein lösliches Protein, wird es in das Medium, das die "Verpackungs-Zelllinie", 293-T, umgibt, sezerniert. Transfiziert man die 293-T-Zellen nur mit dem pOS-Vektor, ohne pKAT, entstehen keine Retroviren. Das Zellkultur-Medium enthält dann nur das lösliche, von den Zellen produzierte Protein. Es wird Medium von pOS-PRV-1-transfizierten Zellen, ohne Retrovirus, mit CFU-Es vermischt, und im Methylcellulose-Medium ausplattiert und die entstandenen Kolonien gezählt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Tabelle 2: Löslichkeit von PRV-1. Die Zahlen geben jeweils die Anzahl der Kolonien an.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
	nicht transfiziert	leerer Vektor (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
Versuch 4		137	187	557

Auch in diesem Versuch haben CFU-E, die mit PRV-1-haltigem Medium versetzt waren, sehr viel mehr hämatopoietische Kolonien ausgebildet, als Kontroll-Zellen. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß PRV-1 einen löslichen Wachstumsfaktor darstellt.

Beispiel 4

Der Wachstumsfaktor PRV-1 ist N-glycosyliert

Aus einer Patientin mit P. vera wurden Granulozyten isoliert und aus diesen Zellen mittels Standardprotokoll Proteinextrakte angefertigt. Diese Proteinextrakte wurden nach dem Protokoll des "N-Glycosidase F Deglycosylation Kits" der

Firma Boehringer Mannheim behandelt. Im einzelnen bedeutet dies, daß die Proteinextrakte mit einem "Denaturierungs Puffer" versetzt wurden, 3 Minuten bei 95°C erhitzt wurden und dann entweder nur mit "Reaktions Puffer" oder mit "Reaktions Puffer" plus N-Glycosidase versetzt wurden. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und die Proteine auf einer PAGE-Gel Elektrophorese mit anschließendem Western Blot analysiert. Das PRV-1 Protein wurde mit einem Antikörper gegen ein Protein mit der Aminosäuresequenz ID-No. 5 detektiert. Die Ergebnisse zeigen, daß aus Granulozyten gereinigtes PRV-1 Protein 60-65 kDa groß ist, während es nach N-Glycosidase-Verdau nur noch 40 kDa groß ist. Dies beweist eindeutig, daß PRV-1 an Asparagin-Resten (Asparagin = N) glycosyliert ist.

Universitätsklinikum Freiburg

Patentansprüche

1. N-glycosyliertes Polypeptid umfassend im wesentlichen eine der folgenden Aminosäuresequenzen:

Aminosäuren 1-437 von Sequenz Nr. 2;
Aminosäuren 1-409 von Sequenz Nr. 2;
Aminosäuren 22-437 von Sequenz Nr. 2;
Aminosäuren 22-409 von Sequenz Nr. 2;

oder ein Fragment davon mit wenigstens 50 Aminosäuren.
2. Polypeptid umfassend im wesentlichen eine der folgenden Aminosäuresequenzen:

Aminosäuren 1-437 von Sequenz Nr. 2;
Aminosäuren 1-409 von Sequenz Nr. 2;
Aminosäuren 22-437 von Sequenz Nr. 2;
Aminosäuren 22-409 von Sequenz Nr. 2.
3. Im wesentlichen reines Polypeptid der Sequenz ID Nr. 2.
4. Polynucleotid umfassend im wesentlichen eine der folgenden Nucleotidsequenzen:

Nucleotide 1-1600 von Sequenz Nr. 1;
Nucleotide 36-1346 von Sequenz Nr. 1;
Nucleotide 36-1262 von Sequenz Nr. 1;
Nucleotide 39-1346 von Sequenz Nr. 1;
Nucleotide 39-1262 von Sequenz Nr. 1;
Nucleotide 99-1346 von Sequenz Nr. 1;
Nucleotide 99-1262 von Sequenz Nr. 1.
5. Rekombinante DNA, die ein Polynucleotid nach Anspruch 4 umfaßt.
6. Rekombinante DNA nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleotidsequenz funktionell verbunden ist mit einem Promotor.

7. Expressionsvektor enthaltend die rekombinante DNA nach Anspruch 5 oder 6.
8. Transformierte oder transfizierte Wirtszelle, die ein Polynucleotid nach Anspruch 4 enthält.
9. Antikörper gegen das PRV-1-Polypeptid von einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein Epitop davon.
10. Antikörper nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein monoklonaler Antikörper ist.
11. Verfahren zum Nachweis von Polycythaemia vera, dadurch gekennzeichnet, daß man das PRV-1-Polypeptid mit einem oder mehreren gegen das PRV-1-Polypeptid oder ein Epitop davon gerichteten Antikörper in einem Immunoassay umsetzt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als Antikörper einen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper nach Anspruch 9 verwendet.
13. Verfahren zum Nachweis von Polycythaemia vera, dadurch gekennzeichnet, daß man das PRV-1-Polynucleotid mit einem RT-PCR-Verfahren oder einem Blotting-Verfahren nachweist.
14. Arzneimittel zur Behandlung von Polycythaemia vera, dadurch gekennzeichnet, daß es neben üblichen Trägern gegen PRV-1 gerichtete polyklonale oder monoklonale Antikörper enthält.
15. Arzneimittel enthaltend ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
16. Arzneimittel enthaltend ein Polynucleotid nach Anspruch 4 und wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

17. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 3 als Wachstumsfaktor.
18. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von pan-Zytopenien und pan-Zytopathien im Knochenmark und in der Zirkulation.
19. Verwendung eines Polynucleotids nach Anspruch 4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von pan-Zytopenien und pan-Zytopathien im Knochenmark und in der Zirkulation.
20. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Behandlung und/oder Vermehrung körpereigener Zellen und/oder etablierter Zelllinien ex vivo oder in vitro.
21. Kit zum Nachweis von Polycythaemia vera enthaltend
wenigstens ein Polynucleotid nach Anspruch 4 oder ein
Fragment davon
und/oder
wenigstens ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3
und/oder
wenigstens einen Antikörper nach Anspruch 9 oder 10.
22. Kit zum Nachweis von Störungen des hämatopoietischen Systems enthaltend
wenigstens ein Polynucleotid nach Anspruch 4 oder ein
Fragment davon
und/oder
wenigstens ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3
und/oder
wenigstens einen Antikörper nach Anspruch 9 oder 10.

23. Kit zur Detektion des PRV-1 Proteins nach einem der Ansprüche 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß es ein ELISA Test Kit ist.

AAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGGGTCATGAGCGCGGTATTACTGCTGGCCCTCC
TGGGGTTCATCCTCCCCTGCCCAGGAGTGCAGGCGCTGCTCTGCCAGTTTGGGACAGTTCAGC
ATGTGTGGAAGGTGTCCGACCTGCCCCGGCAATGGACCCCTAAGAACACCAGCTGCGACAGCG
GCTTGGGGTGCCAGGACACGTTGATGCTCATTGAGAGCGGACCCCAAGTGAGCCTGGTGCTCT
CCAAGGGCTGCACGGAGGCCAAGGACCAGGAGCCCCGCGTCACTGAGCACCGGATGGGCCCCG
GCCTCTCCCTGATCTCCTACACCTTCGTGTGCCGCCAGGAGGACTTCTGCAACAACCTCGTTA
ACTCCCTCCCGCTTTGGGCCCCACAGCCCCCAGCAGACCCAGGATCCTTGAGGTGCCAGTCT
GCTTGTCTATGGAAGGCTGTCTGGAGGGGACAACAGAAGAGATCTGCCCAAGGGGACCACAC
ACTGTTATGATGGCCTCCTCAGGCTCAGGGGAGGAGGCATCTTCTCCAATCTGAGAGTCCAGG
GATGCATGCCCCAGCCAGGTTGCAACCTGCTCAATGGGACACAGGAAATTGGGCCCCGTGGGTA
TGACTGAGAACTGCAATAGGAAAGATTTTCTGACCTGTCATCGGGGGACCACCATTATGACAC
ACGGAAACTTGGCTCAAGAACCCACTGATTGGACCACATCGAATACCGAGATGTGCGAGGTGG
GGCAGGTGTGTCAGGAGACGCTGCTGCTCATAGATGTAGGACTCACATCAACCCTGGTGGGGA
CAAAAGGCTGCAGCACTGTTGGGGCTCAAAATTCCCAGAAGACCACCATCCACTCAGCCCCCTC
CTGGGGTGCTTGTGGCCTCCTATACCCACTTCTGCTCCTCGGACCTGTGCAATAGTGCCAGCA
GCAGCAGCGTTCTGCTGAACTCCCTCCCTCCTCAAGCTGCCCCCTGTCCCAGGAGACCGGCAGT
GTCCTACCTGTGTGTCAGCCCCCTTGGAACCTGTTCAAGTGGCTCCCCCGAATGACCTGCCCCA
GGGGCGCCACTCATTGTTATGATGGGTACATTCTCTCAGGAGGTGGGCTGTCCACCAAAA
TGAGCATTGAGGGCTGCGTGGCCCAACCTTCCAGCTTCTTGTTGAACCACACCAGACAAATCG
GGATCTTCTCTGCGCGTGAGAAGCGTGATGTGCAGCCTCCTGCCTCTCAGCATGAGGGAGGTG
GGGCTGAGGGCCTGGAGTCTCTCACTTGGGGGGTGGGGCTGGCACTGGCCCCAGCGCTGTGGT
GGGGAGTGGTTTGCCCTTCCTGCTAACTCTATTACCCCCACGATTCTTCACCGCTGCTGACCA
CCCACACTCAACCTCCCTCTGACCTCATAACCTAATGGCCTTGACACCAGATTCTTTCCCAT
TCTGTCCATGAATCATCTTCCCCACACAATCATTCATATCTACTCACCTAACAGCAACACT
GGGGAGAGCCTGGAGCATCCGGACTTGCCCTATGGGAGAGGGGACGCTGGAGGAGTGGCTGCA
TGTATCTGATAATACAGACCCTGTC

Fig. 1

MSAVLLLALLGFILPLPGVQA---LLCQFGTVQHVWKVSDLPRQWTPKNTSCD
SGLGCQDTLMLIESGPQVSLVLSKGCTEAKDQEPRVTEHRMGPGLSLISY
TFVCRQEDFCNNLVNSLPLWAPQPPADPGSLRCPVCLSMEGCLEGTTEEI
CPKGTTHCYDGLLRRLRGGGIFSNLRVQGCMPQPGCNLLNGTQEIGPVGMT
ENCNRKDFLTCHRGTTIMTHGNLAQEPTDWTTSENTEMCEVGQVCQETLLL
IDVGLTSTLVGTKGCSTVGAQNSQKTTIHSAPPGVLVASYTHFCSSDLCN
SASSSSVLLNSLPPQAAPVPGDRQCPTCVQPLGTCSSGSPRMTCPRGATH
CYDGYIHLSGGGLSTKMSIQGCVAQPSSFLLNHTRQIGIFSAREKRDVQP
PASQHEGGGAEGLESLTWGVGLALAPALWWGVVCPSC

Fig. 2

SEQUENZPROTOKOLL

- <110> Universitätsklinikum Freiburg
- <120> Das Gen PRV-1 und dessen Verwendung
- <130> E980930
- <140> PCT/EP99/07238
- <141> 1999-09-30
- <150> 198 49 044.5
- <151> 1998-10-23
- <160> 9
- <170> PADAT Sequenzmodul, Version 1.0

<210> 1
<211> 1600
<212> DNA
<213> homo sapiens

<220>
<223>

<400> 1

AAAAGCAGAA AGAGATTACC AGCCACAGAC GGGTCATGAG CGCGGTATTA CTGCTGGCCC	60
TCCTGGGGTT CATCCTCCCA CTGCCAGGAG TGCAGGCGCT GCTCTGCCAG TTTGGGACAG	120
TTCAGCATGT GTGGAAGGTG TCCGACCTGC CCCGGCAATG GACCCCTAAG AACACCAGCT	180
GCGACAGCGG CTTGGGGTGC CAGGACACGT TGATGCTCAT TGAGAGCGGA CCCCAAGTGA	240
GCCTGGTGCT CTCCAAGGGC TGCACGGAGG CCAAGGACCA GGAGCCCCGC GTCCTGAGC	300
ACCGGATGGG CCCC GGCCCTC TCCCTGATCT CCTACACCTT CGTGTGCCGC CAGGAGGACT	360
TCTGCAACAA CCTCGTTAAC TCCCTCCCGC TTTGGGCCCC ACAGCCCCCA GCAGACCCAG	420
GATCCTTGAG GTGCCCAGTC TGCTTGTCTA TGGAAGGCTG TCTGGAGGGG ACAACAGAAG	480
AGATCTGCCC CAAGGGGACC ACACACTGTT ATGATGGCCT CCTCAGGCTC AGGGGAGGAG	540
GCATCTTCTC CAATCTGAGA GTCCAGGGAT GCATGCCCCA GCCAGGTTGC AACCTGCTCA	600
ATGGGACACA GGAAATTGGG CCCGTGGGTA TGA CTGAGAA CTGCAATAGG AAAGATTTTC	660
TGACCTGTCA TCGGGGGACC ACCATTATGA CACACGGAAA CTTGGCTCAA GAACCCACTG	720
ATTGGACCAC ATCGAATACC GAGATGTGCG AGGTGGGGCA GGTGTGTCAG GAGACGCTGC	780
TGCTCATAGA TGTAGGACTC ACATCAACCC TGGTGGGGAC AAAAGGCTGC AGCACTGTTG	840
GGGCTCAAAA TTCCAGAAG ACCACCATCC ACTCAGCCCC TCCTGGGGTG CTTGTGGCCT	900
CCTATACCCA CTTCTGCTCC TCGGACCTGT GCAATAGTGC CAGCAGCAGC AGCGTTCTGC	960
TGAACTCCCT CCCTCCTCAA GCTGCCCCTG TCCCAGGAGA CCGGCAGTGT CCTACCTGTG	1020
TGCAGCCCCT TGGAACCTGT TCAAGTGGCT CCCCCGAAT GACCTGCCCC AGGGGCGCCA	1080
CTCATTGTTA TGATGGGTAC ATTCATCTCT CAGGAGGTGG GCTGTCCACC AAAATGAGCA	1140
TTCAAGGCTG CGTGGCCCAA CCTTCCAGCT TCTTGTTGAA CCACACCAGA CAAATCGGGA	1200
TCTTCTCTGC GCGTGAGAAG CGTGATGTGC AGCCTCCTGC CTCTCAGCAT GAGGGAGGTG	1260
GGGCTGAGGG CCTGGAGTCT CTCCTTGGG GGGTGGGGCT GGCCTGGCC CCAGCGCTGT	1320

GGTGGGGAGT GGTTCGCCCT TCCTGCTAAC TCTATTACCC CCACGATTCT TCACCGCTGC	1380
TGACCACCCA CACTCAACCT CCCTCTGACC TCATAACCTA ATGGCCTTGG ACACCAGATT	1440
CTTTCCCATT CTGTCCATGA ATCATCTTCC CCACACACAA TCATTCATAT CTACTCACCT	1500
AACAGCAACA CTGGGGGAGAG CCTGGAGCAT CCGGACTTGC CCTATGGGAG AGGGGACGCT	1560
GGAGGAGTGG CTGCATGTAT CTGATAATAC AGACCCTGTC	1600

<210> 2
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 2

Met	Ser	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Leu	Pro	Leu
1				5					10					15	
Pro	Gly	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	Cys	Gln	Phe	Gly	Thr	Val	Gln	His	Val
			20					25					30		
Trp	Lys	Val	Ser	Asp	Leu	Pro	Arg	Gln	Trp	Thr	Pro	Lys	Asn	Thr	Ser
		35					40					45			
Cys	Asp	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Gln	Asp	Thr	Leu	Met	Leu	Ile	Glu	Ser
	50					55					60				
Gly	Pro	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Ser	Lys	Gly	Cys	Thr	Glu	Ala	Lys
65					70					75					80
Asp	Gln	Glu	Pro	Arg	Val	Thr	Glu	His	Arg	Met	Gly	Pro	Gly	Leu	Ser
				85					90					95	
Leu	Ile	Ser	Tyr	Thr	Phe	Val	Cys	Arg	Gln	Glu	Asp	Phe	Cys	Asn	Asn
			100					105					110		
Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Pro	Leu	Trp	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Ala	Asp	Pro
		115					120					125			
Gly	Ser	Leu	Arg	Cys	Pro	Val	Cys	Leu	Ser	Met	Glu	Gly	Cys	Leu	Glu
	130					135					140				
Gly	Thr	Thr	Glu	Glu	Ile	Cys	Pro	Lys	Gly	Thr	Thr	His	Cys	Tyr	Asp
145					150					155					160
Gly	Leu	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Gly	Ile	Phe	Ser	Asn	Leu	Arg	Val
			165						170					175	
Gln	Gly	Cys	Met	Pro	Gln	Pro	Gly	Cys	Asn	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Gln
			180					185					190		
Glu	Ile	Gly	Pro	Val	Gly	Met	Thr	Glu	Asn	Cys	Asn	Arg	Lys	Asp	Phe
		195					200					205			
Leu	Thr	Cys	His	Arg	Gly	Thr	Thr	Ile	Met	Thr	His	Gly	Asn	Leu	Ala
	210					215					220				
Gln	Glu	Pro	Thr	Asp	Trp	Thr	Thr	Ser	Asn	Thr	Glu	Met	Cys	Glu	Val
225					230					235					240
Gly	Gln	Val	Cys	Gln	Glu	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Asp	Val	Gly	Leu	Thr
			245						250					255	
Ser	Thr	Leu	Val	Gly	Thr	Lys	Gly	Cys	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Gln	Asn
			260					265					270		
Ser	Gln	Lys	Thr	Thr	Ile	His	Ser	Ala	Pro	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Ala
		275					280					285			
Ser	Tyr	Thr	His	Phe	Cys	Ser	Ser	Asp	Leu	Cys	Asn	Ser	Ala	Ser	Ser
	290					295					300				
Ser	Ser	Val	Leu	Leu	Asn	Ser	Leu	Pro	Pro	Gln	Ala	Ala	Pro	Val	Pro
305					310					315					320
Gly	Asp	Arg	Gln	Cys	Pro	Thr	Cys	Val	Gln	Pro	Leu	Gly	Thr	Cys	Ser
			325						330					335	
Ser	Gly	Ser	Pro	Arg	Met	Thr	Cys	Pro	Arg	Gly	Ala	Thr	His	Cys	Tyr
			340				345						350		
Asp	Gly	Tyr	Ile	His	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Thr	Lys	Met	Ser
		355					360					365			

Ile	Gln	Gly	Cys	Val	Ala	Gln	Pro	Ser	Ser	Phe	Leu	Leu	Asn	His	Thr
370						375					380				
Arg	Gln	Ile	Gly	Ile	Phe	Ser	Ala	Arg	Glu	Lys	Arg	Asp	Val	Gln	Pro
385					390					395					400
Pro	Ala	Ser	Gln	His	Glu	Gly	Gly	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu
				405					410					415	
Thr	Trp	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Pro	Ala	Leu	Trp	Trp	Gly	Val
			420					425					430		
Val	Cys	Pro	Ser	Cys											
		435													

<210> 3
<211> 24
<212> RNA
<213> homo sapiens

<220>
<223>

<400> 3

AAAAGCAGAA AGAGATTACC AGCC

24

<210> 4
<211> 24
<212> RNA
<213> homo sapiens

<220>
<223>

<400> 4

GGCTGGTAAT CTCTTTCTGC TTTT

24

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5

Lys Val Ser Asp Leu Pro Arg Gln Trp Thr Pro Lys Asn
1 5 10

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 6

Ser Ala Arg Glu Lys Arg Asp Val Gln Pro Pro Ala Ser Gln His
1 5 10 15

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> homo sapiens

<220>
<223>

<400> 7

ATTAGGTTAT GAGGTCAGAG GGAGGTT

27

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> homo sapiens

<220>
<223>

<400> 8

GCAGAAAGAG ATTACCAGCC ACAGACGG

28

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> homo sapiens

<220>
<223>

<400> 9

GAATCGTGGG GGTAATAGAG TTAGCAGG

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ional Application No

PCT/EP 99/07238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/475 C07K16/22 G01N33/50 C12Q1/68
A61K39/395 A61K31/70 A61K38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K G01N C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EMBL - EMBEST7 'Online! Entry/Acc.no. AI205247, 19 October 1998 (1998-10-19) HILLIER, L. ET AL.: "ao85e03.x1 Schiller meningioma Homo sapeins cDNA clone IMAGE:1952668 3', mRNA sequence." XP002129279 the whole document	
P,X	WO 98 50552 A (ZYMOGENETICS INC) 12 November 1998 (1998-11-12) cited in the application the whole document	1-10,15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 2000

Date of mailing of the international search report

11/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Smalt, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/EP 99/07238

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>TEMERINAC, S. ET AL.: "Cloning of PRV-1, a novel gene overexpressed in polycythemia vera." ANNALS OF HEAMATOLOGY, vol. 77, no. Suppl. II, 25 October 1998 (1998-10-25), pages S110-Abstr.434, XP000867769 the whole document -----</p>	11-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

onal Application No

PCT/EP 99/07238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9850552 A	12-11-1998	AU 7480198 A	27-11-1998

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07238

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C07K14/475 C07K16/22 G01N33/50 C12Q1/68
A61K39/395 A61K31/70 A61K38/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K G01N C12Q A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE EMBL - EMBEST7 'Online! Entry/Acc.no. AI205247, 19. Oktober 1998 (1998-10-19) HILLIER, L. ET AL.: "ao85e03.x1 Schiller meningioma Homo sapeins cDNA clone IMAGE:1952668 3', mRNA sequence." XP002129279 das ganze Dokument	
P,X	WO 98 50552 A (ZYMOGENETICS INC) 12. November 1998 (1998-11-12) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-10, 15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Januar 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R

INTERNATIONALES RESEARCHENBERICHT

onales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07238

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>TEMERINAC, S. ET AL.: "Cloning of PRV-1, a novel gene overexpressed in polycythemia vera."</p> <p>ANNALS OF HEAMATOLOGY, Bd. 77, Nr. Suppl.II, 25. Oktober 1998 (1998-10-25), Seiten S110-Abstr.434, XP000867769 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	11-14

